


BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Degussa Hüls AG
Kantstr. 2
33790 Halle/Künsebeck

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Degussa Hüls AG Kantstr. 2 Address: 33790 Halle/Künsebeck	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 14041 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2001-02-06
III. VIABILITY STATEMENT	
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2001-02-06 ² . On that date, the said microorganism was (X) ³ viable () ³ no longer viable	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2001-02-08

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.


⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Degussa Hüls AG
Kantstr. 2
33790 Halle/Künsebeck

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: DSM 5715ΔotsA	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 14041
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: (X) a scientific description (X) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2001-02-06 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2001-02-08

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.



J1017 U.S. PTO
10/058945
01/30/02

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 10 760.9
Anmeldetag: 07. März 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Neue für das otsA-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen
Priorität: 30.01.2001 DE 101 03 873.9
IPC: C 21 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. November 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Neue für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das otsA-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das otsA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu 30 mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b),

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb der Degeneriertheit des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptids nicht verändern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind schließlich Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 883,

b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der

Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 884 und 2338,

- 5 c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 2339 und 3010.

Weitere Gegenstände sind:

10 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

15 ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das otsA-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

20 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit
25 einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

30 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die

für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des otsA-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40 oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90% und ganz

besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder einem daraus hergestellten Fragmentes.

5 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthase und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%,
10 bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90% und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte
15 Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von
20 coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das otsA-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere
25 ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die
30 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das

entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- 20 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

- 25 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
- Brevibacterium flavum* FERM-P 1708
- Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712
- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463
- 30 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464
- Corynebacterium glutamicum* DM58-1
- Corynebacterium glutamicum* DG52-5

Corynebacterium glutamicum DSM5715 und
Corynebacterium glutamicum DSM12866.

Das neue, für das Enzym Trehalose-6-Phosphat-Synthase (EC
Nr. 2.4.1.15) kodierende *otsA*-Gen von *C. glutamicum* wurde
5 isoliert.

Zur Isolierung des *otsA*-Gens oder auch anderer Gene von *C.*
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das
Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
10 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
15 Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032,
20 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,
1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum*
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und
Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli*
können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life
30 Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982,
Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich
besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und
rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm
DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the National

Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das otsA-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des otsA-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinmmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen

werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

5 Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten
10 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1
15 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben
20 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH
25 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit
30 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die
35 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ

niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x
5 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit
Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%
Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride
sind weniger stabil und werden durch Waschen unter
10 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise
durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und
gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's
Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,
Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine
15 Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist
gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x
SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der
Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von
50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert
20 werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens
80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens 96% bis 99%
Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Es
ist ebenfalls möglich Polynukleotidfragmente zu isolieren,
die eine vollständige Identität zur Sequenz der
25 eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur
Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt
erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche
Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No.
1603558).
- 30 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann
unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide
synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK,
1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer
35 Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des otsA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

5 Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des otsA-Gens oder die katalytischen/regulatorischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

10 Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und
15 Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191
20 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
25 Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind
30 aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus
35 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen

Regulation und Struktur des Enzyms", Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations") oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations") gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations"), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption") und des Gen-Austauschs („gene replacement").

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise

E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation

in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses
5 im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (*Microbiology* 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

- 10 In das *otsA*-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *otsA*-Gens
eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges,
15 der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang
20 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene oder Allele erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein
25 Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Abschwächung des *otsA*-Gens gleichzeitig eines oder mehrere
30 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- 5 • das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 15 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- 20 • das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin
25 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des otsA-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478, DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxE* (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113),
- 10 • das für die Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen *fda* (Accession No. X17313; von der Osten et al., Molecular Microbiology 3 (11), 1625-1637 (1989)),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen *hom* (EP-A-0131171),
- 15 • das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen *thrB* (Peoples, O.W., et al., Molecular Microbiology 2 (1988): 63 - 72) und
- das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen *panD* (EP-A-1006192) und

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 20 Die Abschwächung der Homoserin-Dehydrogenase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Valin gegen L-Alanin, L-Glycin oder L-Leucin an Position 59 des Enzymproteins, durch den Austausch von L-Valin gegen L-Isoleucin, L-Valin oder L-
- 25 Leucin an Position 104 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Asparagin gegen L-Threonin oder L-Serin an Position 118 des Enzymproteins erreicht werden.

- Die Abschwächung der Homoserin-Kinase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch
- 30 den Austausch von L-Alanin gegen L-Valin, L-Glycin oder L-

Leucin an Position 133 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Prolin gegen L-Threonin, L-Isoleucin oder L-Serin an Position 138 des Enzymproteins erreicht werden.

Die Abschwächung der Aspartat-Decarboxylase kann unter
5 anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch die Austausche L-Alanin gegen L-Glycin, L-Valin oder L-Isoleucin an Position 36 des Enzymproteins erreicht werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren
10 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des otsA-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

15 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
20 zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
25 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

10 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
15 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.
20 Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen
25 eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

30 Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können
35 Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester

eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Folgender Mikroorganismus wurde am 08.02.2001 als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715ΔotsA als DSM 14041.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring

Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

- 10 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wird wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-
15 Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of
20 Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wird mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
25 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

- Anschließend wird die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
30 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wird mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04)

behandelt. Das Ligationsgemisch wird anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- 5 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) werden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank werden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 mg/l Ampicillin ausplattiert werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden rekombinante Einzelklone selektioniert.

15 Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens otsA

- Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem
- 20 Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung
- 25 SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).
- 30 Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wird mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg,

Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wird wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wird. Dieses Ligationsgemisch wird anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgt mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgt nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wird der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgt in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten werden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero-1-Derivate werden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wird mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergibt ein offenes Leseraster von 1485 bp, welches als otsA-Gen bezeichnet wird. Das otsA-Gen kodiert für ein Polypeptid von 485 Aminosäuren.

Beispiel 3

Konstruktion des Vektors pK19mobsacB Δ otsA zur Deletion des otsA-Gens

3.1. Klonierung des otsA-Gens in den Vektor pUC18

- 10 Hierzu wird aus dem Stamm ATCC13032 nach der Methode von Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C.glutamicum* bekannten Sequenz des otsA-Gens werden die im folgenden beschriebenen Oligonukleotide für die Erzeugung des otsA-
15 Deletionsallels ausgewählt (siehe auch SEQ ID No. 3 und SEQ ID No.4):

otsA fwd:

5'- CAC CTA TTC TAA GGA CTT CTT CGA -3'

otsA rev:

- 20 5'-ACC AAC CAG GTG GAA TCT GTC A-3'

- Die dargestellten Primer werden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press)
25 mit der Taq-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland, Produktbeschreibung Taq DNA Polymerase, Product No. 1 146 165) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines ca. 1,8 kb großen DNA-Fragmentes.
30 Das so amplifizierte Produkt wird in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das erhaltene PCR-Produkt wird anschließend mit dem Sure Clone Ligation Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben in den Vektor pUC18 (Amersham Pharmacia Biotech, Cat. No. 27-4949-5 C1) kloniert. Der Vektor pUC18 wurde zuvor mit dem Restriktionsenzym SmaI linearisiert.

Anschließend wird der E.coli Stamm DH5 α mc^r (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In. DNA 10 cloning. A practical approach. Vol.1. ILR-Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7). Die Selektion der Plasmid-tragenden Zellen erfolgt durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrock et al., 15 Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989), der mit 25 mg/l Ampicillin supplementiert worden ist.

Plasmid-DNA wird aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und 20 durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wird pUC18otsA genannt und ist in Figur 1 dargestellt.

25 3.2. Einführen einer Deletion in das klonierte otsA-Genfragment

Aus dem Plasmid pUC18otsA wird durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen PflMI und HpaI aus dem zentralen Bereich des otsA-Gens ein 213 bp großes Fragment herausgeschnitten. Die aus dem PflMI-Verdau entstandenen 30 3'-Überhänge werden mit T4-DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland; Code No. E2040Y) entsprechend den Vorschriften des Herstellers entfernt. Der Restvektor wird mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland; Code No. 27-0870-04) nach

Herstellerangaben autoligiert und der Ligationsansatz in den E. coli Stamm DH5 α (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical Approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7). Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgt durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 25 mg/l Ampicillin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten, um das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wird pUC18 Δ otsA genannt.

3.3. Konstruktion des Austauschvektors pK19mobsac Δ otsA

Durch vollständige Spaltung des in Beispiel 3.2 erhaltenen Vektors pUC18 Δ otsA mit den Restriktionsenzymen SacI/XbaI wird das otsA-Deletionsallel isoliert. Das ca. 1,6 kb große otsA Δ -Fragment wird nach Auftrennung in einem Agarosegel (0,8%) mit Hilfe des Qiagenquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) aus dem Agarosegel isoliert. Die durch den Restriktionsverdau entstandenen 5'- und 3'-Überhänge werden mit der T4-DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland; Code No. E2040Y) entsprechend den Vorschriften des Herstellers entfernt.

Das so behandelte otsA-Deletionsallel wird mit dem mobilisierbaren Klonierungsvektor pK19mobsacB (Schäfer et al., Gene 14: 69-73 (1994)) zur Ligation eingesetzt. Dieser wurde zuvor mit dem Restriktionsenzym SmaI aufgespalten und danach mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Die Vektor-DNA wird mit dem otsA-Deletionsallel gemischt und mit T4-DNA-Ligase (Amersham- Pharmacia, Freiburg, Germany) behandelt.

Anschließend wird der E.coli Stamm DH5 α mc α r (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In. DNA cloning. A practical approach. Vol.1. ILR-Press, Cold Spring Habor, New York, 1989) elektroporiert. Die Selektion der Plasmid-tragenden Zellen erfolgt durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrock et al., Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Habor, New York, 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden ist.

Plasmid-DNA wird aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und das klonierte otsA-Deletionsallel mittels Sequenzierung durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) verifiziert. Das Plasmid wird pK19mobsacB Δ otsA genannt und ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 4

Deletionsmutagenese des otsA-Gens in dem C. glutamicum Stamm DSM 5715

Der in Beispiel 3.3 genannte Vektor pK19mobsacB Δ otsA wird nach der Elektroporationsmethode von Tauch et al. (1989 FEMS Microbiology Letters 123: 343-347) in Corynebacterium glutamicum DSM5715 elektroporiert. Der Vektor kann in DSM5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom integriert hat. Die Selektion von Klonen mit integriertem pK19mobsacB Δ otsA erfolgt durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5 g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden ist. Die Inkubation erfolgt für 2 Tage bei 33°C.

Angewachsene Klone werden auf LB-Agarplatten mit 25 mg/l Kanamycin ausgestrichen und für 16 Stunden bei 33°C inkubiert. Um die Excision des Plasmides zusammen mit der vollständigen chromosomalen Kopie des *otsA*-Gens zu erreichen, werden die Klone anschließend auf LB-Agar (Sambrock et al., Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989) mit 10% Sucrose angezogen. Das Plasmid pK19mobsacB enthält eine Kopie des *sacB*-Gens, welches Sucrose in die für *C. glutamicum* toxische Levansucrase umwandelt. Auf LB-Agar mit Sucrose wachsen daher nur solche Klone an, bei denen das integrierte pK19mobsacB Δ *otsA* wiederum excisiert hat. Bei der Excision kann zusammen mit dem Plasmid entweder die vollständige chromosomale Kopie des *otsA*-Gens excisieren, oder die unvollständige Kopie mit der internen Deletion. Um nachzuweisen, daß die unvollständige Kopie von *otsA* im Chromosom verblieben ist, wird das Plasmid pK9mobsacB Δ *otsA* nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA einer potentiellen Deletionsmutante wird nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) isoliert und jeweils mit dem Restriktionsenzymen EcoRI und PstI in getrennten Ansätzen geschnitten. Die entstehenden Fragmente werden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Anhand der entstandenen Fragmente kann gezeigt werden, daß der Stamm DSM5715 seine vollständige Kopie des *otsA*-Gens verloren hat und stattdessen nur noch über die deletierte Kopie verfügt.

Der Stamm wird als *C. glutamicum* DSM5715 Δ *otsA* bezeichnet und als Reinkultur am 08.02.2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig,

Deutschland) als DSM 14041 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

- 5 Der in Beispiel 4 erhaltene *C. glutamicum* Stamm DSM5715 Δ otsA wird in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

- 10 Dazu wird der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wird eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wird das Vollmedium CgIII verwendet.

- 15 Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Saccharose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wird auf pH 7.4 eingestellt

- 20 Diesem wird Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wird 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wird eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD beträgt. Für die Hauptkultur wird das Medium CgXII

(Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175:5595-5603) mit Zusatz von 0,1 g/l Leucin verwendet.

Medium CgXII

MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	42 g/l
Harnstoff	5 g/l
Salze:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
K ₂ HPO ₄	1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,25 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	10 mg/l
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mg/l
CuSO ₄	0,2 mg/l
NiCl ₂	0,02 mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
Protokatechusaure (sterilfiltriert)	0,03 mg/l
Saccharose (getrennt autoklaviert)	6% (w/v)

MOPS und die Salzlösung werden auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml
5 Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wird Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgt bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 73 Stunden wird die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH,
10 München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wird mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

15 In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl mM
DSM5715	8,2	39
DSM5715 Δ otsA	8,4	52

Folgende Figuren sind beigefügt:

- Figur 1: Plasmid pUC18otsA
- 20 • Figur 2: Plasmid pK19mobsacB Δ otsA

Bei der Angabe der Basenpaarzahlen handelt es sich um ca.-Werte, die im Rahmen der Reproduzierbarkeit erhalten werden.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

lacZ':	5'-Terminus des lacZ α Genfragmentes
'lacZ:	3'-Terminus des lacZ α Genfragmentes
otsA:	otsA-Gen
Amp:	Ampicillin-Resistenzgen
oriV:	ColE1-ähnlicher Origin aus pMB1
RP4mob:	RP4-Mobilisierungs-Site
Kan:	Kanamycin-Resistenzgen
otsA':	5'-terminales Fragment des pck-Gens
'otsA:	3'-terminales Fragment des pck-Gens
sacB:	das für das Protein Levansucrose kodierende sacB-Gen
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI
HpaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym HpaI
PflMI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym PflMI
PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI
SacI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym SacI
XbaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 010037 BT

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 3010

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (884)..(2338)

<223> otsA-Gen

25

<400> 1

attgcggggc ttactgcgct gatgggttct gcgttttatt acctcttcgt tgtttattta 60

30

ggccccgtct ctgccgctgc gattgctgca acagcagttg gtttcactgg tggtttgctt 120

gcccgtcgat tcttgattcc accgttgatt gtggcgattg ccggcatcac accaatgctt 180

ccaggtctag caatttacgg cggaatgtac gccacctga atgatcaaac actcatgggt 240

35

ttcaccaaca ttgcggttgc tttagccact gtttcacac ttgccgctgg cgttggtttt 300

ggtgagtgga ttgccgcgag gctacgtcgt ccaccacgct tcaaccata ccgtgcattt 360

accaaggcga atgagttctc cttccaggag gaagctgagc agaatcagcg ccggcagaga 420

40

aaacgtccaa agactaatca gagattcggt aataaaagggt aaaaatcaac ctgcttaggc 480

gtcttttcgt taaatagcgt agaatatcgg gtcgatcgct tttaaact caggaggatc 540

45

cttgccggcc aaaatcacgg aactcgtcc caccocagaa tcccttcacg ctggtgaaga 600

ggaaaccgca gccggtgccc gcaggattgt tgccacctat tctaaggact tcttcgacgg 660

50

cgtcactttg atgtgcatgc tcggcggtga aactcagggc ctgcgttaca ccaaggctgc 720

ttctgaacac gaggaagctc agccaaagaa ggctacaaag cggactcgta aggcaccagc 780

taagaaggct gctgctaaga aaacgaccaa gaagaccact aagaaaacta ctaaaaagac 840

55

caccgcaaag aagaccacaa agaagtctta agccggatct tat atg gat gat tcc 895

Met Asp Asp Ser

	aat agc ttt gta gtt gtt gct aac cgt ctg oca gtg gat atg act gtc	943
	Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Val Asp Met Thr Val	
	5 10 15 20	
5	cac oca gat ggt agc tat agc atc tcc ccc agc oca ggt ggc ctt gtc	991
	His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser Pro Gly Gly Leu Val	
	25 30 35	
10	acg ggg ctt tcc ccc gtt ctg gaa oca cat cgt gga tgt tgg gtc gga	1039
	Thr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg Gly Cys Trp Val Gly	
	40 45 50	
15	tgg cct gga act gta gat gtt gca ccc gaa oca ttt oga aca gat acg	1087
	Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro Phe Arg Thr Asp Thr	
	55 60 65	
20	ggt gtt ttg ctg cac cct gtt gtc ctc act gca agt gac tat gaa ggc	1135
	Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala Ser Asp Tyr Glu Gly	
	70 75 80	
25	ttc tac gag ggc ttt tca aac gca acg ctg tgg cct ctt ttc cac gat	1183
	Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp Pro Leu Phe His Asp	
	85 90 95 100	
30	ctg att gtt act ccg gtg tac aac acc gat tgg tgg cat ggc ttt cgg	1231
	Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp Trp His Ala Phe Arg	
	105 110 115	
35	gag gta aac ctc aag ttc gct gaa gcc gtg agc oca gtg gcg gca cac	1279
	Glu Val Asn Leu Lys Phe Ala Glu Ala Val Ser Gln Val Ala Ala His	
	120 125 130	
40	ggt gcc act gtg tgg gtg cag gac tat cag ctg ttg ctg gtt cct ggc	1327
	Gly Ala Thr Val Trp Val Gln Asp Tyr Gln Leu Leu Leu Val Pro Gly	
	135 140 145	
45	att ttg cgc cag atg cgc cct gat ttg aag atc ggt ttc ttc ctc cac	1375
	Ile Leu Arg Gln Met Arg Pro Asp Leu Lys Ile Gly Phe Phe Leu His	
	150 155 160	
50	att ccc ttc cct tcc cct gat ctg ttc cgt cag ctg ccg tgg cgt gaa	1423
	Ile Pro Phe Pro Ser Pro Asp Leu Phe Arg Gln Leu Pro Trp Arg Glu	
	165 170 175 180	
55	gag att gtt cga ggc atg ctg ggc gca gat ttg gtg gga ttc cat ttg	1471
	Glu Ile Val Arg Gly Met Leu Gly Ala Asp Leu Val Gly Phe His Leu	
	185 190 195	
60	gtt caa aac gca gaa aac ttc ctt gcg tta acc cag cag gtt gcc ggc	1519
	Val Gln Asn Ala Glu Asn Phe Leu Ala Leu Thr Gln Gln Val Ala Gly	
	200 205 210	
65	act gcc ggg tct cat gtg ggt cag ccg gac acc ttg cag gtc agt ggt	1567
	Thr Ala Gly Ser His Val Gly Gln Pro Asp Thr Leu Gln Val Ser Gly	
	215 220 225	
70	gaa gca ttg gtg cgt gag att ggc gct cat gtt gaa acc gct gac gga	1615
	Glu Ala Leu Val Arg Glu Ile Gly Ala His Val Glu Thr Ala Asp Gly	
	230 235 240	

5	agg cga gtt agc gtc ggg gcg ttc ccg atc tcg att gat gtt gaa atg	1663
	Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser Ile Asp Val Glu Met	
	245 250 255 260	
10	ttt ggg gag gcg tcg aaa agc gcc gtt ctt gat ctt tta aaa acg ctc	1711
	Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp Leu Leu Lys Thr Leu	
	265 270 275	
15	gac gag ccg gaa acc gta ttc ctg gcc gtt gac cga ctg gac tac acc	1789
	Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp Arg Leu Asp Tyr Thr	
	280 285 290	
20	aag gcc att ttg cag ccg ctg ctt gcg ttt gag gaa ctg ctg gaa tcc	1807
	Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu Glu Leu Leu Glu Ser	
	295 300 305	
25	ggc gcg ttg gag gcc gac aaa gct gtg ttg ctg cag gtc gcg acg cct	1855
	Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu Gln Val Ala Thr Pro	
	310 315 320	
30	tcg cgt gag ccg att gat cac tat cgt gtg tcg cgt tcg cag gtc gag	1903
	Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser Arg Ser Gln Val Glu	
	325 330 335 340	
35	gaa gcc gtc gcc cgt atc aat ggt cgt ttc ggt ccg atg ggg cgt ccc	1951
	Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly Arg Met Gly Arg Pro	
	345 350 355	
40	gtg gtg cat tat cta cac agg tca ttg agc aaa aat gat ctc cag gtg	1999
	Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys Asn Asp Leu Gln Val	
	360 365 370	
45	ctg tat acc gca gcc gat gtc atg ctg gtt acg cct ttt aaa gac ggt	2047
	Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr Pro Phe Lys Asp Gly	
	375 380 385	
50	atg aac ttg gtg gct aaa gaa ttc gtg gcc aac cac ccg gac gcc act	2095
	Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn His Arg Asp Gly Thr	
	390 395 400	
55	ggt gct ttg gtg ctg tcc gaa ttt gcc gcc gcg gcc act gag ctg acc	2143
	Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala Ala Thr Glu Leu Thr	
	405 410 415 420	
60	ggt gcg tat tta tgc aac cca ttt gat gtg gaa tcc atc aaa cgg caa	2191
	Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu Ser Ile Lys Arg Gln	
	425 430 435	
65	atg gtg gca gct gtc cat gat ttg aag cac aat ccg gaa tct gcg gca	2239
	Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro Glu Ser Ala Ala	
	440 445 450	
70	acg cga atg aaa acg aac agc gag cag gtc tat acc cac gac gtc aac	2287
	Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr His Asp Val Asn	
	455 460 465	

gtg tgg gct aat agt ttc ctg gat tgt ttg gca cag tgg gga gaa aac 2335
 Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala Gln Ser Gly Glu Asn
 470 475 480

5 tca tgaacggcgc acgaatcgcg accataggcg ttcttccgct tgcctttaactg 2388
 Ser
 485

10 ctggcgctct gtgggttcaga caccgctggaa atgacagatt ccacctgggt ggtgacccaat 2448
 atttacacgg atccagatga gtogaattcg atcagtaato ttgtcatttc ccagccacgc 2508
 ttagattttg gcaattcttc cctgtctgggt ttcactggct gtgtgccttt taaggggcgt 2568

15 goggaattct tccaaaatgg tgagcaaaag cctgttctcg atgocgatta tgtgaccttg 2628
 ccttccctgg atttcgataa acttcccgat gattgccaag gacaagaact caaagttcat 2688
 aacgagctgg ttgatcttct gctgggttct ttgaaatct ccaggacttc tgggttcagaa 2748

20 atcttctga ctacggatgt cgatgaactc gatcggccag caatccgctt ggtgtcctgg 2808
 atcgcgcga catcttaagg tgcacgggct ttaaagtgc aggggttctg tgggatccgt 2868

25 acactggctc ccctgacttt gactattgag gaaatcgcca agaccacaaa gcttttggtt 2928
 gtgtccgatt ttgatggaac catcgcagga tttagcaagg acgcttacaa cgttccctatc 2988
 aaccagaaat ccctcaaggc gg 3010

30
 <210> 2
 <211> 485
 <212> PRT
 35 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
 Met Asp Asp Ser Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Val
 1 5 10 15

40 Asp Met Thr Val His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser Pro
 20 25 30

45 Gly Gly Leu Val Thr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg Gly
 35 40 45

Cys Trp Val Gly Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro Phe
 50 55 60

50 Arg Thr Asp Thr Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala Ser
 65 70 75 80

Asp Tyr Glu Gly Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp Pro
 85 90 95

55 Leu Phe His Asp Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp Trp
 100 105 110

	His	Ala	Phe	Arg	Glu	Val	Asn	Leu	Lys	Phe	Ala	Glu	Ala	Val	Ser	Gln
			115					120					125			
5	Val	Ala	Ala	His	Gly	Ala	Thr	Val	Trp	Val	Gln	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu
		130					135					140				
	Leu	Val	Pro	Gly	Ile	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Pro	Asp	Leu	Lys	Ile	Gly
		145				150					155					160
10	Phe	Phe	Leu	His	Ile	Pro	Phe	Pro	Ser	Pro	Asp	Leu	Phe	Arg	Gln	Leu
				165						170					175	
	Pro	Trp	Arg	Glu	Glu	Ile	Val	Arg	Gly	Met	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Val
15				180					185					190		
	Gly	Phe	His	Leu	Val	Gln	Asn	Ala	Glu	Asn	Phe	Leu	Ala	Leu	Thr	Gln
			195					200					205			
20	Gln	Val	Ala	Gly	Thr	Ala	Gly	Ser	His	Val	Gly	Gln	Pro	Asp	Thr	Leu
		210					215					220				
	Gln	Val	Ser	Gly	Glu	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Ile	Gly	Ala	His	Val	Glu
		225				230					235					240
25	Thr	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Val	Ser	Val	Gly	Ala	Phe	Pro	Ile	Ser	Ile
				245						250					255	
	Asp	Val	Glu	Met	Phe	Gly	Glu	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Leu	Asp	Leu
30				260					265					270		
	Leu	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Pro	Glu	Thr	Val	Phe	Leu	Gly	Val	Asp	Arg
			275					280					285			
35	Leu	Asp	Tyr	Thr	Lys	Gly	Ile	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Phe	Glu	Glu
		290					295					300				
	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Glu	Ala	Asp	Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Gln
		305				310					315					320
40	Val	Ala	Thr	Pro	Ser	Arg	Glu	Arg	Ile	Asp	His	Tyr	Arg	Val	Ser	Arg
				325						330					335	
	Ser	Gln	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Ile	Asn	Gly	Arg	Phe	Gly	Arg
45				340					345					350		
	Met	Gly	Arg	Pro	Val	Val	His	Tyr	Leu	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Lys	Asn
			355					360					365			
50	Asp	Leu	Gln	Val	Leu	Tyr	Thr	Ala	Ala	Asp	Val	Met	Leu	Val	Thr	Pro
		370					375					380				
	Phe	Lys	Asp	Gly	Met	Asn	Leu	Val	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Ala	Asn	His
		385				390					395					400
55	Arg	Asp	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Ser	Glu	Phe	Ala	Gly	Ala	Ala
				405						410					415	
	Thr	Glu	Leu	Thr	Gly	Ala	Tyr	Leu	Cys	Asn	Pro	Phe	Asp	Val	Glu	Ser
				420					425					430		

Ile Lys Arg Gln Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro
 435 440 445
 5 Glu Ser Ala Ala Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr
 450 455 460
 His Asp Val Asn Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala Gln
 465 470 475 480
 10 Ser Gly Glu Asn Ser
 485
 15
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 20
 <220>
 <223> Primer otsA fwd
 25
 <400> 3
 GAGCTATTCT AAGGACTTCT TCGA 24
 30
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 35
 <220>
 <223> Primer otsA rev
 40
 <400> 4
 ACCAACCAGG TGGAATCTGT CA 22

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das otsA-Gen kodierende
Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
15 Trehalose-6-Phosphat-Synthase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
20 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - 25 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 5 6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung
unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC
durchgeführt wird.
- 10 7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das otsA-Gen
abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
- 15 9. Coryneforme Bakterien hinterlegt bei der Deutschen
Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen unter der
Nr. DSM 14041.
- 20 10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
durchführt:
- 25 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen
man zumindest das otsA-Gen oder dafür kodierende
Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere
ausschaltet;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in
den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen
Corynebacterium glutamicum Stamm hinterlegt bei der
Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
5 unter der Nr. DSM 14041 einsetzt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
10 verstärkt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
15 gewünschten L-Aminosäure verringern.
14. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das otsA-Gen
kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere
20 ausschaltet.
15. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die
regulatorischen (bzw. katalytischen) Eigenschaften des
Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das
25 Polynukleotid otsA kodiert.
16. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
30 mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,

- 16.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 16.3 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 5 16.4 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 16.5 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
- 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 10 16.7 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyC,
- 16.8 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 15 16.9 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 16.10 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 16.11 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal
- verstärkt bzw. überexprimiert.
17. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
- 20 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 25 17.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
- 17.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi,

- 17.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*,
17.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*,
17.5 das für die Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase
kodierende Gen *fda*,
5 17.6 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen *hom*,
17.7 das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen *thrB*,
17.8 das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen
panD
10 abschwächt.
18. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der
beanspruchten Sequenz, trägt.
- 15 19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium*
glutamicum einsetzt.
- 20 20. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
otsA-Gens aufweisen, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid,
25 enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den
Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungs sonden
einsetzt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro
30 arrays oder DNA-chips einsetzt.

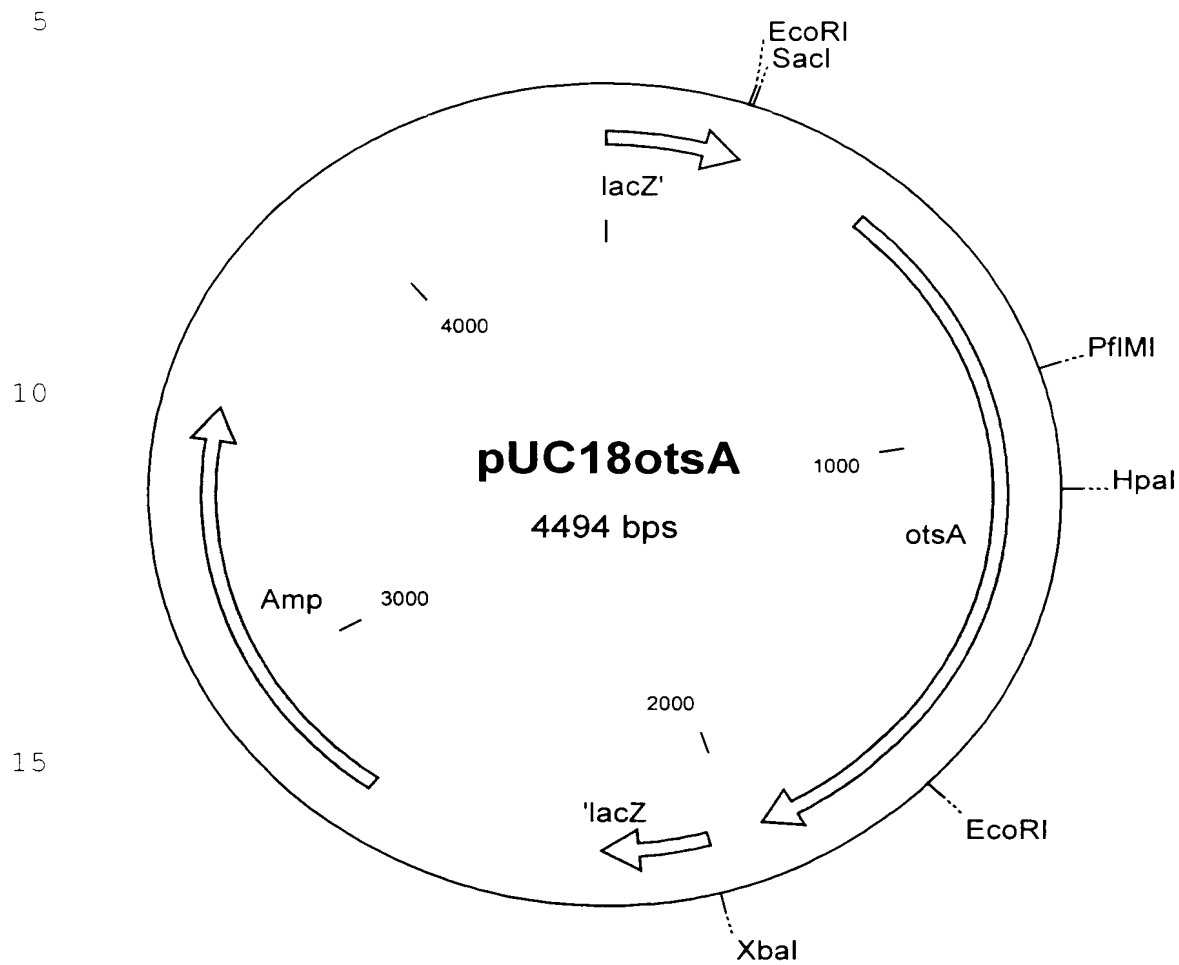
Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
20 denen zumindest das otsA-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmid pUC18otsA



Figur 2: Plasmid pK19mobsacB Δ otsA